Über die

Wirkung einiger noch nicht untersuchter fluoreszierender Stoffe auf Paramaecien.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Konrad Heinrich,
approb. Arzt aus München.

München, 1903.
Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Über die

Wirkung einiger noch nicht untersuchter fluoreszierender Stoffe auf Paramaecien.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

gesamten Medizin

verfasst und einer

Hohen medizinischen Fakultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Konrad Heinrich,
approb. Arzt aus München.

München, 1903.

Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Gedruckt mit Genehmigung der medizin. Fakultät der Universität München.

Referent: Herr Professor Dr. von Tappeiner.

Meiner lieben Braut

gewidmet.

Anschliessend an die Arbeit v. Tappeiners: „Über die Wirkung von Phenylchinolinen und Phosphinen auf niedere Organismen", die einen stark schädigenden Einfluss dieser Körper auf Infusorien nachgewiesen hatte, untersuchte O. Raab das Verhalten des Acridins und seiner Derivate auf Paramaecium caudatum und kam dabei zu dem höchst merkwürdigen Ergebnis, dass die dem Tageslicht ausgesetzten Lösungen eine stärkere schädigende Wirkung auf die Paramaecien ausüben als dieselben oder sogar noch konzentriertere Lösungen im Dunkeln.

Als Ursachen dieser Erhöhung der Toxität nahm er drei Möglichkeiten an:

I. Einwirkung der Acridinlösung auf das Licht.
II. Einwirkung des Lichtes auf die Paramaecien.
III. Einwirkung des Lichtes auf die Acridinlösung.

An der Hand eingehender Untersuchungen kam er zu dem Resultat, dass die ersten beiden Möglichkeiten auszuschliessen sind, dass also nur von einer Einwirkung des Lichtes auf die Acridinlösung die Rede sein könne. Diese Lichtwirkung führte er auf die fluoreszierende Eigenschaft dieser Stoffe zurück.

Er bewies dies durch verschiedene Versuche, so auch mit Eosin, von welchem eine Lösung 1 : 30000 Paramaecien innerhalb weniger Stunden tötete, während bei 1 : 1000, im

Dunkeln gehalten, dieselben nach mehreren Tagen noch am Leben waren, Dasselbe wies O. Raab im Verlauf weiterer Untersuchungen nach an anderen fluoreszierenden Körpern, wie Chinolinrot, Chinin und salzsaurem Harmalin. Dass diese Erhöhung der toxischen Wirkung lediglich auf der Fluorescenz dieser Körper beruhe, bewies O. Raab damit, dass Lösungen anderer giftiger, aber nicht fluoreszierender Stoffe, wie Kristallviolett und Fuchsin, keinen Wirkungsunterschied bei Licht und Dunkelheit zeigen; in gleicher letztgenannter Weise wirkt ein fluoreszierender, jedoch nicht giftiger Körper, wie zum Beispiel das von O. Raab untersuchte Aesculin.

O. Raab fasst seine Erfahrungen in Kürze zusammen:

„I. Die Einwirkung des Tageslichtes hat bei den Versuchen mit Acridin-, Phosphin- und Eosinlösungen einen grossen schädlichen Einfluss.

II. Dieser Einfluss beruht auf der Erzeugung der Fluoreszenz.

III. Diejenigen Strahlen wirken, welche die Fluoreszenz am stärksten erregen.

IV. Es ist möglich, dass fluoreszierende Körper die Energie der Lichtstrahlen in lebende chemische Energie umzusetzen vermögen.

V. Es ist wahrscheinlich, dass die Fluoreszenz auch im tierischen Organismus eine Rolle spielt, jedoch nur in viel geringerer Stärke.“

Dasselbe, was nun Raab an Paramaecien nachwies und im Punkt V auch für die Zelle höher organisierter Tiere als wahrscheinlich andeutete, bewies R. Jakobson am Flimmerepithel der Rachenschleimhaut des Frosches. Im Gegensatz zur blossen Lichteinwirkung, zerstreutes Tageslicht oder direktes Sonnenlicht, die die Flimmerbewegung in

keiner Weise beeinträchtigte, so lange kein Feuchtigkeitsmangel vorhanden war, fand er, dass der Zusatz einer mit physiologischer Na Cl-Lösung hergestellten Lösung verschiedener fluoreszierender Stoffe beträchtliche Differenzen in der Lebensdauer bei Präparaten in Belichtung und im Dunkeln zutage förderte.

Ähnliche Resultate erzielte er bei subkutaner Injektion mit 0,02 g Eosin an Fröschen, die 24 resp. 48 Stunden im Dunkeln gehalten wurden; trotz intensiver Rotfärbung der Rachenschleimhaut trat keine Beeinträchtigung der Flimmerbewegung ein; ausgeschnittene Stücke starben bei Belichtung in 3, im Dunkeln in 24 Stunden. Subkutan injizierte Frösche zeigten, dem Lichte ausgesetzt, Lähmungserscheinungen der hinteren Extremitäten und baldigen Tod, während im Dunkeln nur geringe Vergiftungserscheinungen auftraten.

R. Jakobson bewies dadurch eine gleiche Wirkung auf Zellen höherer Tiere wie auf das einzellige Paramaecium caudatum, ferner fand auch er, dass bei tierischen Zellen mit Lösungen nicht giftiger, fluoreszierender Körper, wie des Äsculins, oder solcher giftiger, nicht fluoreszierender Stoffe ein Wirkungsunterschied zwischen Belichtung und Dunkelhaltung nicht besteht.

Als im Anschluss an diese Arbeiten die Frage aufgeworfen wurde, ob nicht auch Fermente eine solche Einwirkung durch fluoreszierende Stoffe erleiden, ergab sich das überraschende Resultat, dass saccharifizierende und peptonisierende Enzyme (Invertin, Diastase, Papain) ebenfalls durch Anwesenheit gewisser fluoreszierender Stoffe bei Zutritt von Licht ihre Wirksamkeit nahezu oder vollständig einbüssten, während sie im Dunkeln durch diese Körper nicht beeinflusst wurden. Allerdings wirken nicht alle fluoreszierenden Stoffe auf die Fermente ein: auf Diastase und Invertin wirken von den bisher untersuchten nur das

Eosin, Chinolinrot und ein Präparat, das E. Merck als Magdalarot in den Handel bringt, jedoch verschieden ist von dem gewöhnlichen Magdala- oder Naphthalinrot.

Ebenso wie die Fermente, werden auch die Toxine beeinflusst, von denen allerdings bisher nur das Rizin in den Kreis der Beobachtung gezogen wurde. Letzteres verliert durch fluoreszierende Stoffe und Licht nicht nur sein Agglutinierungsvermögen für rote Blutkörperchen, sondern auch einen bedeutenden Teil seiner Toxicität.

Anschliessend an diese Einwirkung auf Zellen, Fermente und Toxine lagen therapeutische Versuche nahe, die denn auch v. Tappeiner und Jesionek ausführten; die beiden berichten hierüber in einer vorläufigen Mitteilung in der Münchener Medizinischen Wochenschrift. Sie verwendeten zu der Behandlung eine Lösung von Eosin.

Da im Laboratorium des pharmakologischen Instituts fortwährend neue fluoreszierende Stoffe auf ihre Einwirkung auf Zellen, Fermente und Toxine geprüft werden, überliess mir Herr Prof. v. Tappeiner, einige derselben hinsichtlich ihrer Wirkung auf Zellen zu untersuchen.

Als Untersuchungsobjekt wurde Paramaecium caudatum gewählt.

Zu den Versuchen wurden gewählt Congorot, Uranin, Resorcinblau, Rhodamin III B und Safranin. Alle diese Körper haben als gemeinsame Eigenschaft die Fluoreszenz, sowie die Giftigkeit auf Paramaecien. In welchem Grade die Toxicität dieser Körper durch die Lichteinwirkung erhöht wird, soll im folgenden dargetan werden.

Die Technik, wie die Versuche ausgeführt wurden, ist der einfache Kammerversuch mit Beobachtung im hängenden Tropfen mittels Mikroskop und Lupe. Zu einem auf ein Deckgläschen mit einer feinen Haarpipette gebrachten Tropfen einer Paramaecienreinkultur kam ein gleich grosser einer

entsprechend konzentrierten Farbstofflösung. Für die Untersuchungen war es unerlässlich, die Ränder der Kammer gut einzufetten und die Kammer mit einigen Tropfen Wassers zu versehen, um des Präparat vor allzu schneller Verdunstung zu bewahren, da Präparate oft Tage lang beobachtet wurden.

Der erste untersuchte Körper war das Congorot.

Congorot,

ein Disazokörper des Benzidins, absorbiert im Spektrum bei hellem Tageslicht die Strahlen von 9,8—11,2. Es ist ein rotbraunes Pulver, gibt rote Lösungen mit einem Stich ins Braune und hat sehr schwache rote Fluorescenz.

Es wurden zunächst Lösungen hergestellt 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000 und mit diesen, da ja die Lichteinwirkung auf diesen Körper noch unbekannt war, Versuche bei zerstreutem Tageslicht angestellt. Durch den Zusatz eines gleich grossen Tropfens der Farbstofflösung zu einem Tropfen Paramaecienkultur ergaben sich folgende Lösungen: 1 : 2000, 1 : 20000, 1 : 200000. Dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt, zeigte sich schon nach Ablauf von einigen Minuten im Innern der Paramaecien eine intensive Rot- und Blaufärbung, die dem Infusorium ein getüpfeltes Aussehen verlieh und, wie es schien, analog den Vacuolen angeordnet war. Es war ein heller Tag, nach 24 und 36 Stunden waren die Paremaecien noch in der konzentriertesten Lösung am Leben, zeigten noch die charakteristische Färbung.

Es wurden weitere Versuche mit stärkeren Konzentrationen bei Belichtung und im Dunkeln angestellt und dabei folgendes gefunden:

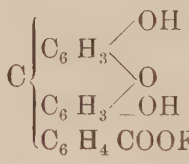
	Zerstr. Tageslicht (heller Tag)	Im Dunkeln
1 : 200	lebend nach 24 Std., tot nach 25 Std.	lebend nach 72 Std.
1 : 250	„ „ 24 „ „ „ 29 „	„ „ 72 „
1 : 500	„ „ 24 „ „ „ 30 „	„ „ 72 „
1 : 1000	„ „ 24 „	

Wie aus dieser Tabelle erhellt, ist einerseits die absolute Giftigkeit des Congorots eine sehr geringe, da selbst in sehr starken Lösungen die Paramaecien, dem Dunkeln ausgesetzt, eine sehr lange Lebensdauer aufweisen, andererseits ist auch die relative Giftigkeit, d. h. die infolge der fluoreszierenden Eigenschaft unter Lichteinwirkung bedingte Erhöhung der Toxicität eine sehr minimale. Diese geringe Wirkung dürfte wohl der geringen Fluorescenz zuzuschreiben sein.

Als zweiter Versuchskörper wurde gewählt das Uranin.

Uranin

von der Formel:



ist chemisch ein dem Eosin nahe verwandter Farbstoff, dessen Absorptionsstreifen im Spektrum liegen zwischen 14,2 und 16,9, ferner zwischen 17,8 und 19,1. In seiner Wirkung ist es jedoch, wie die Versuche von O. Raab und mir ergaben, ungefähr zehnmal schwächer wie Eosin. Uranin ist ein rotes Pulver, löst sich leicht in heissem Wasser mit gelblichroter Farbe und zeigt starke gelbgrüne Fluorescenz.

Zunächst werden Präparate hergestellt in Lösung 1 : 1000 und dieselben im Licht und Dunkeln beobachtet, bei dem Lichtpräparat waren nach sechs Stunden alle Paramaecien abgestorben, während die im Dunkeln belassenen noch nach 24 Stunden am Leben waren. Am einfachsten dürfte das Resultat der weiteren Versuche wohl aus der folgenden Tabelle zu ersehen sein:

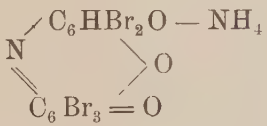
	Zerstr. Tagesl. (heller Tag)	Im Dunkeln	Sonnenlicht
1 : 250	tot nach 40 Min.	lebend nach 24 Std.	—
1 : 500	„ „ 2½ Std.	„ „ 24 „	—
1 : 1000	„ „ 6 „	„ „ 24 „	—
1 : 2000	„ „ 6 „	„ „ 24 „	—
1 : 4000	leb. nach 24 „	„ „ 24 „	—
1 : 5000	„ „ 24 „	—	—
1 : 10000	—	—	sofort tot
1 : 20000	—	—	tot nach 1½ Std.
1 : 40000	—	—	„ „ 2½ „
1 : 80000	—	—	lebend nach 24 „

An diesem Tage war es erfreulicherweise möglich, auch Präparate der Einwirkung des direkten Sonnenlichtes auszusetzen. Das Verhältnis von absoluter und relativer Giftigkeit beträgt bei zerstreutem Tageslicht 1 : 16, bei direktem Sonnenlicht 1 : 320. Die Lichtgiftwirkung (relative Giftigkeit) ist also hier bedeutend stärker wie beim Congorot, wo es bei gleicher Konzentration nur hinsichtlich der Lebensdauer differierte. Immerhin ist hier die absolute Giftigkeit eine ziemlich schwache, während hier die durch die Fluorescenz bedingte (relative) Giftigkeit schon deutlich in die Augen springt.

Als dritter Körper reiht sich an das Resorcinblau.

Recorcinblau.

Dieser Farbstoff ist das Ammoniaksalz des Tetrabrom- und Hexabromresorufin und hat folgende Formel:



Der Körper zeigt im Spektrum einen Absorptionsstreifen von 8,8 – 9,5; seine Lösung ist amethystblau und zeigt eine schmutzig rötlichbraune Fluorescenz.

Eine Einwirkung des Lichtes auf diesen Körper war nachweisbar. Bei einer Lösung 1 : 20000 waren sämtliche Paramaecien bereits nach drei Stunden abgestorben, während die Präparate im Dunkelzimmer noch nach 66 Stunden volle Lebensfähigkeit zeigten.

Das Nähere ergibt die Tabelle:

	Zerstr. Tageslicht (heller Tag)	Im Dunkeln
1 : 2500	tot nach 20 Min.	tot nach 6 Std.
1 : 5000	„ „ 1 Std.	lebend nach 24 Std.
1 : 10000	„ „ 2 „	„ „ 24 „
1 : 20000	„ „ 3 „	„ „ 24 „
1 : 40000	„ (fast alle) nach 24 Std.	„ „ 24 „
1 : 80000	lebend nach 24 Std.	„ „ 24 „

Demnach zeigt dieser Körper eine höhere absolute Giftigkeit als die beiden ersterwähnten, die absolute im Verhältnis zur relativen Giftigkeit beträgt 1 : 10.

Es folgten in der Untersuchungsreihe zwei Rhodaminkörper, Rhodamin B und Rhodamin III B; es sind basische, den Phthaleïnen sehr nahestehende Körper.

Rhodamin B, dessen zwei Absorptionsstreifen im Spektrum zwischen 10,9 und 12,1, zwischen 13,1 und 14,0 liegen, gibt bläulichrote Lösungen mit gelber Fluorescenz, Rhodamin III B hat ebenfalls zwei Absorptionsstreifen von 10,8 bis 11,9 und von 13,0—13,9; die Lösungen sind violettrot mit starker gelbroter Fluorescenz.

Rhodamin B,

das zunächst zu den Versuchen herangezogen wurde, zeigte bei einem Lichtpräparat 1 : 2000, dass schon nach acht Minuten der Tod der reichlich im Präparate vorhandenen Paramaecien eingetreten war. Es war dies natürlich absolute Giftigkeitswirkung, da ein gleiches Präparat im Dunkelzimmer nach ca. zehn Minuten schon kein lebendes Paramaecium mehr aufwies. Es wurden also Präparate mit schwächeren Konzentrationen angefertigt.

Die Resultate sind aus nachfolgender Tabelle ersichtlich:

	Zerstr. Tageslicht (heller Tag)	Im Dunkeln
1 : 2000	tot in 8 Min.	tot in 10 Min.
1 : 4000	—	tot nach 3 Std.
1 : 5000	tot in 1½ Std.	lebend nach 24 Std.
1 : 10000	lebend nach 24 Std.	—

Präparate im direkten Sonnenlicht anzufertigen, war der Witterung halber unmöglich. Während also die absolute Giftigkeit eine ziemlich hohe ist, beträgt deren Verhältnis zur relativen Giftigkeit nur ca. 1 : 2.

Eine stärkere Wirkung zeigt das weit giftigere

Rhodamin III B.

Bei einem Lichtpräparat 1 : 10000 konnte schon nach 10 Minuten der Tod mit Sicherheit konstatiert werden, bei 1 : 20000 schon nach 25 Minuten.

Mit diesem Körper wurden sehr ausgedehnte Versuche angestellt, wie nachfolgende Tabelle beweist:

	Zerstr. Tageslicht (heller Tag)	Im Dunkeln	Sonnenlicht
1 : 2000	sofort tot	sofort tot	—
1 : 5000	„ „	tot in 1 Std.	—

	Zerstr. Tageslicht (heller Tag)	Im Dunkeln	Sonnenlicht
1 : 10000	tot in 10 Min.	tot in 1½ Std.	—
1 : 20000	„ „ 25 „	„ „ 2 „	—
1 : 30000	—	„ „ 4 „	—
1 : 40000	—	„ „ 4 „	—
1 : 50000	—	tot (fast alle) in 4½ Std.	—
1 : 60000	—	lebend nach 24 Std.	—
1 : 70000	tot nach 2 Std.	—	—
1 : 80000	—	—	—
1 : 90000	—	—	—
1 : 100000	tot nach 6 Std.	—	tot in 1 Std.
1 : 125000	tot (fast alle) nach 6½ Std.	—	—
1 : 150000	lebend nach 24 Std.	—	tot in 1 Std.
1 : 200000	—	—	„ nach 1½ Std.
1 : 400000	—	—	„ „ 1½ „
1 : 500000	—	—	lebend „ 24 „

Für Rhodamin III B ergibt sich also als approximative untere Giftigkeitsgrenze (absolute Giftigkeit) eine Lösung 1 : 10000. Das Verhältnis von absoluter und relativer Giftigkeit ist bei zerstreutem Tageslicht 1 : nahezu 3, bei direktem Sonnenlicht 1 : 10.

Zuletzt wurde noch das Safranin in den Kreis der Beobachtung gezogen.

Safranin

ist ein basischer Farbstoff, und zwar das Amido- und Oxyderivat der Azoniumbasen, es hat einen Absorptionsstreifen zwischen 11,5 und 15,5, bei 13 zeigt sich ein schmaler Zwischenstreif, die Lösungen sind weinrot und haben rotgoldgelbe Fluorescenz. Auch das Safranin wirkt sehr stark giftig; eine Lösung 1 : 1000—4000 tötet Paramaecien sofort im Licht wie im Dunkeln.

Auch hier wurden zahlreiche Präparate angefertigt, deren Resultat die nachfolgende Tabelle wiedergibt:

	Zerstr. Tagesl. (trüber Tag)	Im Dunkeln
1 : 1000	sofort tot	sofort tot
1 : 2000	„ „	„ „
1 : 4000	„ „	„ „
1 : 5000	tot in ½ Std.	tot in ½ Std.
1 : 10000	„ nach 2 Std.	„ nach 2½ Std.
1 : 20000	„ „ 2½ „	„ „ 3 „
1 : 30000	—	lebend nach 24 Std.
1 : 40000	tot nach 3 Std.	—
1 : 80000	„ „ 3 „	—
1 : 160000	„ „ 3½ „	—
1 : 200000	„ „ 3¾ „	—
1 : 400000	„ „ 4 „	—
1 : 800000	„ „ 5½ „	—
1 : 1000000	lebend nach 24 Std.	—

Die absolute untere Giftigkeitsgrenze des Safranins liegt also zwischen 1 : 20000 und 1 : 30000. Dasselbe hat unter den sechs von mir beobachteten Körpern die höchste absolute Giftigkeit; das Verhältnis der letzteren zur relativen Giftigkeit beträgt 1 : 33; es ist dies gleichfalls das höchste Resultat der in dieser Arbeit untersuchten Körper.

Die Lichtwirkung dieses Stoffes, d. h. das Verhältnis von absoluter zu relativer Giftigkeit ist sogar noch etwas höher als die des Eosins, welche, wie Raab gefunden, 1 : 30 beträgt.

Es dürfte sich empfehlen, das Ergebnis dieser Arbeit tabellarisch zusammenzufassen:

	absolute untere Giftigkeitsgrenze	Verhältnis von absol. und rel. Giftigkeit
Congorot	—	—
Uranin	1 : 200	1 : 16
Resorcinblau	1 : 2500	1 : 10
Rhodamin B	1 : 4000	1 : 2
Rhodamin III B	1 : 50 000	1 : 3
Safranin	1 : 30 000	1 : 33
Eosin (Raab)	1 : 1000	1 : 30

Der besseren Übersicht halber habe ich am Schlusse das von O. Raab für das Eosin gefundene Resultat angefügt; wie aus der Tabelle leicht ersichtlich, zeigt sich am wirksamsten das Safranin.

Über eine etwaige therapeutische Verwendbarkeit soll hiermit nichts gesagt sein, da die Untersuchungen dieses Körpers auf Fermente und Toxine noch nicht in den Kreis der Beobachtung gezogen sind. Ausserdem sieht man, dass dieser Stoff entschieden giftiger ist als das Eosin, indem seine absolute Giftigkeit sich zu der des Eosins verhält wie 30 : 1.

Zum Schlusse drängt es mich, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. v. Tappeiner, für die gütige Anregung zu diesem Thema, sowie Herrn Privatdozenten Dr. Jodlbauer für die tatkräftige Unterstützung bei dieser Arbeit meinen wärmsten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Litteratur:

O. Raab, Zeitschr. f. Biol. Bd. XLIV.
R. Jakobson, Zeitschr. f. Biol. Bd. XLI.
O. Tillmetz, Inaug.-Dissert. 1903.
Münchener Medizin. Wochenschr. Jahrg. 1903.

Lebenslauf.

Ich, Konrad Heinrich, geboren am 29. November 1877 zu Fürth als Sohn des Kaufmanns Christian Heinrich, besuchte die Volksschule zu München vom Jahre 1884—1888, trat dann in das Kgl. Luitpoldgymnasium ein, das ich im Jahre 1897 absolvierte. Meinen medizinischen Studien lag ich ob an der Kgl. Ludwig-Maximilians-Universität zu München. Mein Staatsexamen beendete ich am 23. Juni 1903.